

(2) 试验法 II (2016 年度版)

振荡法

1. 适用范围

该试验法¹适用于具有抗菌性能的抗菌加工制品（以下称为制品）的抗菌性能试验²。本试验法适用于形状特殊或体积过小的试样³。但原则上，适用于抗菌加工制品的抗菌性试验方法—JIS Z 2801 法的试样，不可使用本试验法进行抗菌性能试验。

2 试验菌

2.1 试验菌种⁴

(1) 金黄色葡萄球菌 NBRC 12732 (ATCC 6538P)

(2) 大肠杆菌 NBRC 3972 (ATCC 8739)

¹ 注意：每组试验片的表面积与菌液量以及试验菌数的比例要保持一致，否则试验结果可能出现波动。

² 若试验片表面只有部分经过抗菌加工，请调整试验片，使抗菌加工面积达到规定量。

³ 本试验不适用于以下抗菌加工制品：

- (1) 无法保持本试验法中规定的试样表面积与菌液量之比的制品
- (2) 会因振荡导致试验片发生变化（如试验片表面剥落）的制品
- (3) 纸、布、无纺布等纤维状的，厚度不可忽略不计的制品？
- (4) 在适用于本试验法的特殊形状试样中，体积大、且不能与菌液均匀接触的试样（如有密集气孔的发泡海绵制品等）应在以下条件下进行试验：
 - ① 在菌液中添加 0.05% 的非离子表面活性剂（Tween80）。
 - ② 在接种菌液后，应用移液管的前端或接种棒等数次按压试样，使试样和菌液充分接触。
 - ③ 计算试样总表面积需假设表面光滑，不考虑气孔的存在。应准备 2 到 4 个试样，试样厚度不超过 3 mm。进行本试验时，请注意以下几点。
 - 为了防止振荡容器的盖子变松导致菌液泄漏，可用胶带对盖子部分进行密封。
 - 酒精喷洒是清洁试样的基本方法。但对于海绵制品等多孔且难以干燥的试样，委托方和试验人员应协商确定合适的清洁方法（高压灭菌处理、干热灭菌、紫外线照射、EOG 灭菌等），并在报告中说明清洁条件。
 - 由于海绵制品接触自来水的机会较多，因此在经过委托方和试验人员协商后，耐水性试验中也可使用自来水对其进行处理，并在报告书中注明。另外，多孔制品经过耐水试验处理后需要较长的干燥时间，委托方和试验人员应协商确定合适的

干燥方法，并在报告书中注明干燥条件（方法、温度、时间等）。

- ⁴ 选择两种试验菌种，分别作为革兰氏阳性细菌或革兰氏阴性细菌的代表菌种。SEK 使用 *Staphylococcus aureus*（金黄色葡萄球菌）和 *Klebsiella pneumoniae*（肺炎克雷伯菌）作为试验菌种。

2.2 试验菌的保存

将从菌株保存机构得到的保存菌株移植到普通琼脂培养基¹中，在 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 的温度下培养 48 小时后，在 $5 \sim 10^\circ\text{C}$ 下冷藏保存。保存有效期为 1 个月，每 1 个月进行一次传代培养，继代次数最多为 5 次。

3. 试验准备

一般情况下，试验中使用的化学药品和器具应为日本工业标准以及日本药典中指定的化学药品和器具。

3.1 器具、仪器及材料

- (1) 移液管（牛奶移液管及 10 毫升以上容量的 M 型移液器）
- (2) 恒温器（精度在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以内的机型）
- (3) 振荡培养机²（精度在 $\pm 1^\circ\text{C}$ 以内的机型）
- (4) 灭菌培养皿（内径 $80 \text{ mm} \sim 100 \text{ mm}$ ，高 $15 \text{ mm} \sim 25 \text{ mm}$ ）
- (5) 灭菌杯³（使用市售内部容量为 60 ml 的烧杯作为灭菌杯）

3.2 培养基

(1) 普通肉汤培养基（NB 培养基）

肉提取物 5.0 g
蛋白胨 10.0 g
氯化钠 5.0 g
精制水 1,000 g
pH 7.0~7.2

(2) 普通琼脂培养基（NA 培养基）

在 (1) NB 培养基的基础上再添加 2.0g 肉提取物和 1.5% 琼脂

(3) 标准琼脂培养基（SA 培养基）

酵母提取物 2.5g
胰蛋白胨 5.0g
葡萄糖 1.0g
琼脂 15.0g
精制水 1,000g
pH 7.1 ± 0.1

(4) 乙醇（纯度大于 99%）

¹ 在斜面培养基上培养。另外，由于细菌的药剂敏感性会受到培养基的干燥程度影响，故培养基应在配制后的 24 小时内使用。

² 应使用水平方向振动频率 150 ± 10 rpm、振幅 30 ± 5 mm、温度调节精度在 $\pm 1^\circ \text{C}$ 以内的机型。

³ 灭菌杯的形状不同会导致试验结果产生差异，因此请使用荣研器材生产的 60ml 灭菌检查用烧杯（外径 63mm，深度 35mm，内部容积 60ml）或同等品。

(5) 磷酸缓冲生理盐水

磷酸缓冲生理盐水：将 34 g KH_2PO_4 溶解于 500 ml 的精制水中，使用 NaOH 水溶液调节 pH 值到 7.2 后定容至 1000 ml。取 1.25ml 该溶液使用生理盐水（0.85%NaCl）稀释为 1000ml 溶液，并在 121°C 下高压蒸汽灭菌 15 分钟。

4. 试样和未加工试样

原则上抗菌性能试验对象的试样是制品本身¹。未加工试样是指没有进行抗菌加工的制品。如：试样为海绵的情况下，需记录其尺寸并记录试验结果。

5. 试验方法

5.1 试验菌的培养²

(1) 将试验菌移植至 NA 培养基中，并在 $35 \pm 1^\circ \text{C}$ 的温度下培养 16~24 小时（预培养）³。

(2) 将前一段（1）中培养的细菌取 1 白金环⁴的量移植到 NA 培养基中，在温度 $35 \pm 1^\circ \text{C}$ 下培养 16-20 小时（预培养）。

5.2 接种用菌液的制备

用灭菌蒸馏水将 NB 培养基稀释 500 倍，使细菌的浓度在 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^4$ 个/ml 之间，调节其 pH 至 7.0 ± 0.2 ，确保细菌分散均匀，作为接种用菌液。

5.3 试验片的制备

(1) 切割或准备多个试样⁶，使其总表面积⁷达到 $32 \pm 5 \text{ cm}^2$ ，¹用整体²浸透⁴了乙醇³的日本纱布或脱脂棉轻轻擦拭整个试验片表面 2-3 次后进行干燥。取三个（预处理）试验片作为抗菌加工试验片。

(2) 切割或准备多个未加工试样，使其总表面积达到 $32 \pm 5 \text{ cm}^2$ ，用与抗菌加工试验片相同的方式对试样进行预处理，并取 3 个作为未加工试验片。

¹ 振荡法可用于对特殊形状或体积小的制品进行试验，可使用制品本身作为试样。

² 若在液体培养基中进行培养，液体培养基成分可能会混入接种用菌液中，从而影响试验结果，因此，预培养应选用 NA 培养基。

由于培养基的干燥程度会影响细菌的药物敏感性，因此若制备后的培养基不立即使用，应将其保存在 5 至 10°C 的温度下。

请勿使用制备时间超过一个月的培养基。

³ 两段预培养均采用斜面培养基。

⁴ 经 5.1 (1) 预培养后的细菌，最多可在 5 至 10° C 下冷藏保存 3 天。

⁵ 应先用盐酸或氢氧化钠将 1/500 NB 培养基的 pH 调节至 7.0±0.2 且灭菌后使用。在 pH 值发生偏移，则只能用 (3) 2.6 中的磷酸盐缓冲液进行稀释。

⁶ 原则上，该试验方法不适用于具有吸水性的试样。

⁷ 试验片形状复杂且难以计算表面积的情况下，也可以通过某种方法确定表面积，并保证其与菌液量和菌数之比。

此处所说的试验片的表面积是指试样的原表面(称为固有表面)，不包括通过切割或切片制成试验片而形成的表面(称为新表面)。

由于新表面不是试样的原表面，抗菌性能有可能与固有表面不同，故试验片的新表面的表面积应在固有表面表面积(32±5cm²)的 10%以下(3±0.5cm²)。若新表面也具有抗菌性，则不考虑其与固有表面表面积之比。

5.4 试验操作

(1) 将抗菌加工试验片(3片)和未加工试验片(3片)放入灭菌杯，将接种用菌液接种到其中，并确保比表面积和接种用菌液的比例达到 32 cm² : 10 ml (含 1.0~5.0 x 10⁵细菌)。盖上盖子后，将其放入温度为 35±1° C 的恒温振荡器中，固定在震动台上，避免灭菌杯移动。调节恒温振荡器，使灭菌杯在振幅 30 mm、水平振荡数 150 rpm 的条件下振荡 24±1 小时。⁵

(2) 对照组准备 3 个灭菌杯，分别用 10 ml 接种用菌液(含有 1.0~5.0 x 10⁵个细菌)接种，盖上盖子后，将其放入温度为 35±1° C 的恒温振荡器中，在与(1)相同的条件下培养。

5.5 活菌数的测定

(1) 准备三个灭菌杯，分别接种 10 ml 的接种用菌液，立即使用 SA 培养基的琼脂板培养法⁶ (在温度 35±1° C 下培养 40~48 小时)测定 1ml 该溶液中的活菌数，计算 3 个活菌数(接种后即时测定对照组)的对数值平均值¹，其值为 A。在测定活菌数期间应使用无菌磷酸盐缓冲盐水进行稀释。

(2) 使用 SA 培养基的琼脂平板培养法(35±1° C 下培养 40~48 小时)，测定培养 24 小时后的对照组用灭菌杯(3个)中 1ml 溶液中的活菌数，计算 3 个活菌数(对照组)的对数值平均值，其值为 B。

(3) 使用 SA 培养基的琼脂平板培养法(35±1° C 下培养 40~48 小时)，测定培养 24 小时后的未加工试验片灭菌杯(3个)中 1ml 溶液中的活菌数，计算 3 个活菌数(未加工试验组)的对数值平均值，其值为 C。

(4) 使用 SA 培养基的琼脂平板培养法(35±1° C 下培养 40~48 小时)，测定培养 24 小时后的抗菌加工试验片灭菌杯(3个)中 1ml 溶液中的活菌数，计算 3 个活菌数(抗菌加工试验组)的对数值平均值，其值为 D。

¹ 将薄膜状的试样在此限制范围内进行裁剪后可作为试验片。另外，纸、布、无纺布等虽然具有吸水性，但其厚度可以忽略不计的材料，也可与薄膜状试样作同等处理。

² 试验片表面可能会附着有脱模剂、洗涤剂、润滑剂、手上的油脂等污渍。这些污渍会在一定程度上影响试验结果的准确性，故原则上应去除试验片上的污渍后再进行试验。

³ 由于灭菌水可能无法去除油污，因此可使用能在一定程度上去除油污的乙醇（纯度 99%以上）作为擦除液。

⁴ 为了清除附着在试样上的油污，并能在短时间内对其进行处理和充分干燥，请勿将测试片浸入乙醇中或将乙醇喷洒在测试片上。

⁵ 由于振荡条件因仪器而异，故允许振幅在 30 ± 5 mm 的范围内、水平振荡频率在 150 ± 10 rpm 的范围内波动。对于会因振荡而外形损坏的试样，可以减少振幅和水平振荡频率。试验结果中需记载振荡时的振幅和水平震荡数。

⁶ 活菌数的测定参考「食品、添加物等的规格标准（1959 年 12 月 28 日厚生省告示第 370 号）」中记载的「细菌数（活菌数）的测定方法」。

6. 试验成立条件

当满足以下 4 项试验条件时，该试验被视为有效。

(1) 「接种后即时测定对照组」和「对照组」的 3 个活菌数对数值，分别根据下式进行计算，结果²均 ≤ 0.2 。

$$(\text{最高对数值} - \text{最低对数值}) / (\text{对数平均值}) \leq 0.2$$

(2) B（「对照组」的对数值平均值）与 A（「接种后即时测定对照组」的对数值平均值）相比减少量³ ≤ 1 。

$$A - B \leq 1$$

(3) 3 个「接种后即时测定对照组」试样的活菌数平均值应在 $1.0 \sim 5.0 \times 10^5$ 个/杯之间。

(4) 3 个「未加工试验组」试样的活菌数⁴ 应超过 1.0×10^3 个/杯。

¹ 分别求出 3 个活菌数的对数值并取平均值，四舍五入第 3 位，保留 2 位小数。若活菌数小于 10，则表示为「<10」，计算对数时以「10」进行计算。但当所有测量值均「<10」时，对数值的平均值显示为「<1」。

² 计算值四舍五入到小数点后 2 位，保留 1 个有效数字。

³ 减少量的计算结果应四舍五入并保留小数点后 1 位。

⁴ 若全部未加工试验片的活菌数都在 1.0×10^3 个/杯以下，则证明未加工试料本身就具有抗菌性能，试验不成立。在这种情况下，应该变更试验方法或对试验片进行预处理后再进行试验。

① 通过增加接种用菌液的营养成分，来抵消未加工试样抗菌性能的方法

如 ABS 树脂、氯乙烯树脂等抗菌活性相对较弱的材料，可将接种用菌液的营养成分调节至高于标准内的 1/500 NB，例如 1/100 NB，1/50 NB，1/10 NB 等，以抵消未加工试样抗菌性能。

在这种情况下，请在试验方法中说明接种用菌液的营养成分。

② 通过干燥使未加工试样中含有的抗菌物质挥发的方法

如三聚氰胺树脂、FRP 树脂、氨基类涂料、三聚氰胺类涂料等含有游离甲醛的制品，其未加工试样本身也具有很强的抗菌能力。在这种情况下，可以通过干燥试样使甲醛挥发，从而消除甲醛对未加工试样抗菌性能的影响。最佳干燥温度和时间因试样材质而异，可选用不同的干燥温度和时间对未加工试验片进行预处理，而后再进行抗菌性能评价试验。

在这种情况下，应在试验方法中说明预处理的条件。

7. 试验结果的表示

用下式计算¹[抗菌活性值]时，结果需保留到小数点后一位

$$(C-A) - (D-A) = (C-D)$$

¹C（「未加工试验组」对数值的平均值）或 C（「抗菌加工试验组」对数值的平均值）「<1」时，则应以「1」进行计算。

以上

除非法律许可，否则在未经授权的情况下复制本档的全部或部分即构成侵害著作权。

抗菌制品技术协议会

改訂：平成 28 年 9 月 13 日